

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002093

International filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-027815  
Filing date: 04 February 2004 (04.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

04. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 4 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 2 7 8 1 5

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 0 2 7 8 1 5

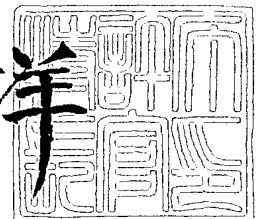
出 願 人  
Applicant(s): 株式会社エーピーアイ コーポレーション



2 0 0 5 年 4 月 1 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 J11357  
【提出日】 平成16年 2月 4日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 09/02  
C12N 15/53  
C12P 17/00

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社三菱化学  
科学技術研究センター内  
【氏名】 出来島 康方

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社三菱化学  
科学技術研究センター内  
【氏名】 川端 潤

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社三菱化学  
科学技術研究センター内  
【氏名】 上田 誠

【特許出願人】  
【識別番号】 396020464  
【氏名又は名称】 株式会社エーピーアイコーポレーション

【代理人】  
【識別番号】 100103997  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 長谷川 暁司

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 035035  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

2-ペンタノン又は2-ヘキサノンに、下記(A)～(F)の何れかのDNAを発現させた形質転換体細胞、該細胞処理物及び／又は培養液を作用させ、(S)-2-ペンタノール又は(S)-2-ヘキサノールを生成させることを特徴とする(S)-2-ペンタノール又は(S)-2-ヘキサノールの製造方法。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

(B) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1から複数個のアミノ酸が欠失、付加または置換されているアミノ酸配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と50%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

(D) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA。

(E) 配列番号2に記載の塩基配列において、1から複数個の塩基が欠失、付加または置換されている塩基配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNA。

(F) 配列番号2に記載の塩基配列またはその相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNA。

## 【請求項 2】

2-ペンタノン又は2-ヘキサノンに、ブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、ホルテア (*Hortaea*) 属、イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、及び、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属からなる群より選ばれる微生物、該微生物処理物及び／又は培養液を作用させ、(S)-2-ペンタノール又は(S)-2-ヘキサノールを生成させることを特徴とする(S)-2-ペンタノール又は(S)-2-ヘキサノールの製造方法。

## 【請求項 3】

微生物が、ブレッタノマイセス・ブルクセレンシス (*Brettanomyces bruxellensis*)、キャンディダ・シリンドラケア (*Candida cylindracea*)、キャンディダ・ファマータ (*Candida famata*)、キャンディダ・クルセイ (*Candida krusei*)、キャンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*)、キャンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、キャンディダ・ゼイラノイデス (*Candida zeylanoides*)、デッケラ・アノマルス (*Dekkera anomalous*)、ホルテア・ウェルネッキ (*Hortaea werneckii*)、イサチェンキア・スクチュラータ (*Issatchenkia scutulata*)、ロッデロマイセス・エロンジスポラス (*Lodderomyces elongisporus*)、オガタエア・ポリモーファ (*Ogataea polymorpha*)、ピキア・ベッセイ (*Pichia besseyi*)、ピキア・カクトフィラ (*Pichia cactophila*)、ピキア・セゴビエンシス (*Pichia segobienensis*)、ピキア・スパルティナエ (*Pichia spartinae*)、ピキア・トレハロフィラ (*Pichia trehalophila*) 及び、ロドトルラ・ミヌータ (*Rhodotorula minuta*) からなる群より選ばれる微生物であることを特徴とする請求項2に記載の製造方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】 (S) - 2 - ペンタノール又は (S) - 2 - ヘキサノールの製造方法

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、2 - ペンタノン又は2 - ヘキサノンにイサチェンキア属等に属する微生物、該微生物処理物及び／又は培養物を作用させて、医薬、農薬等の中間体原料として産業上有用な化合物である (S) - 2 - ペンタノール又は (S) - 2 - ヘキサノールを製造する方法に関し、また、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードするDNAを発現させた形質転換体細胞、該細胞処理物および／または培養液を用いた光学活性アルコール類の製造方法に関する。

## 【背景技術】

【0002】

(S) - 2 - ペンタノールあるいは (S) - 2 - ヘキサノールを化学的に製造する方法としては、例えば、2 - ペンタノンに対しポリアミドアミンとグルコノラクトンから成るデンドリマー存在下で還元を行う方法（非特許文献1）又は、2 - ヘキサノンに対し光学活性ボロンを用いて還元する方法（特許文献1）などが知られている。しかしながらこれらは生成物の光学純度が満足のいくものではない。

【0003】

一方、微生物の菌体及び／又は該菌体処理物を用いて光学活性なアルコール体を生成する方法としては、ラセミ体のエステル化合物を、微生物を作用させることにより光学選択的にエステル加水分解することにより、光学活性なアルコール体を生成する方法が知られているが（特許文献2）、収率が低いという問題があった。また、ケト基を有する化合物を立体選択的に還元し、光学活性なアルコール体を生成する方法としては、2 - ペンタノン又は2 - ヘキサノンに微生物を作用させることにより製造する方法（非特許文献2）が知られているが菌体処理物の調製が煩雑である、仕込み濃度が低いなどの問題があり実用的ではなかった。

【特許文献1】特開平11-240894号公報

【特許文献2】特開平11-215995号公報

【非特許文献1】J. Am. Chem. Soc., Vol.123, p.5956-5961, 2001

【非特許文献2】Tetrahedron: Asymmetry, vol.14, p.2659-2681, 2003

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、より光学純度の高い (S) - 2 - ペンタノールあるいは (S) - 2 - ヘキサノールを工業的に安価に製造できる新規な製造方法を提供することを本発明の課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記課題を解決するために、(S) - 2 - ペンタノールあるいは (S) - 2 - ヘキサノールの製造方法について鋭意検討した結果、原料となる2 - ペンタノンあるいは2 - ヘキサノンを還元して (S) - 2 - ペンタノールあるいは (S) - 2 - ヘキサノールを生成する微生物のスクリーニングを行ったところ、ブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、ホルテア (*Hortaea*) 属、イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、及び、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属からなる群より選ばれる微生物を用いることにより、2 - ペンタノンあるいは2 - ヘキサノンを基質として (S) - 2 - ペンタノールあるいは (S) - 2 - ヘキサノールを簡便に、効率よく生成することができることを見出した。さらに、単離した微生物の一つであるイサチェンキア (*Issatchenkia*) 属微生物より2 - ペンタノン又は2 - ヘキサノンを還元して (S) - 2 - ペンタノール又は (S) - 2 - ヘキサノールを生成する酵素、及び該酵素をコードするDNAを単離してその塩基配列を解析した。さらに、該DNAを発現させた形質

転換体を作製し、該形質転換体細胞、該細胞処理物および／または培養液を、原料となる 2-ペンタノンあるいは 2-ヘキサノンに作用させることにより、高い光学純度かつ高濃度で目的物 (S) - 2-ペンタノールあるいは (S) - 2-ヘキサノールを得ることができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

#### 【0006】

すなわち、本発明の要旨は、以下のとおりである。

(1) 2-ペンタノン又は 2-ヘキサノンに、下記 (A) ~ (F) の何れかの DNA を発現させた形質転換体細胞、該細胞処理物及び／又は培養液を作用させ、(S) - 2-ペンタノール又は (S) - 2-ヘキサノールを生成させることを特徴とする (S) - 2-ペンタノール又は (S) - 2-ヘキサノールの製造方法。

(A) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA。

(B) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加または置換されているアミノ酸配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と 50 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードする DNA。

(D) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA。

(E) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 から複数個の塩基が欠失、付加または置換されている塩基配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する DNA。

(F) 配列番号 2 に記載の塩基配列またはその相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する DNA。

(2) 2-ペンタノン又は 2-ヘキサノンに、ブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、ホルテア (*Hortaea*) 属、イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、及び、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属からなる群より選ばれる微生物、該微生物処理物及び／又は培養液を作用させ、(S) - 2-ペンタノール又は (S) - 2-ヘキサノールを生成させることを特徴とする (S) - 2-ペンタノール又は (S) - 2-ヘキサノールの製造方法。

(3) 微生物が、ブレッタノマイセス・ブルクセレンシス (*Brettanomyces bruxellensis*)、キャンディダ・シリンドラケア (*Candida cylindracea*)、キャンディダ・ファマータ (*Candida famata*)、キャンディダ・クルセイ (*Candida krusei*)、キャンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*)、キャンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、キャンディダ・ゼイラノイデス (*Candida zeylanoides*)、デッケラ・アノマルス (*Dekkera anomalous*)、ホルテア・ウェルネッキ (*Hortaea werneckii*)、イサチェンキア・スクチュラータ (*Issatchenkia scutulata*)、ロッデロマイセス・エロンジスポラス (*Lodderomyces elongisporus*)、オガタエア・ポリモーファ (*Ogataea polymorpha*)、ピキア・ベッセイ (*Pichia besseyi*)、ピキア・カクトフィラ (*Pichia cactophila*)、ピキア・セゴビエンシス (*Pichia segobiensis*)、ピキア・スパルティナエ (*Pichia spartinae*)、ピキア・トレハロフィラ (*Pichia trehalophila*) 及び、ロドトルラ・ミヌータ (*Rhodotorula minuta*) からなる群より選ばれる微生物であることを特徴とする (2) に記載の製造方法。

#### 【発明の効果】

#### 【0007】

本発明の方法により、医薬、農薬等の中間体原料として産業上有用な化合物である (S) - 2-ペンタノールあるいは (S) - 2-ヘキサノールを高光学純度かつ高収率で得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

## 【0008】

以下に記載する構成要件の説明は、本発明の実施態様の一例であり、これらの内容に特定はされない。

本発明の(S)-2-ペンタノール又は(S)-2-ヘキサノールの製造方法は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は該アミノ酸配列のホモログであってカルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質(以下これを単に「カルボニル還元酵素」と称することがある)をコードするDNAを発現させた形質転換株を用いて実施することができる。

## 【0009】

本明細書において、カルボニル還元酵素活性とは、カルボニル基含有化合物中のカルボニル基を不斉還元して光学活性なアルコール類とする活性をいう。このような活性は、カルボニル基含有化合物を基質として含有し、さらにNADPHを補酵素として含有する反応系において、酵素として、目的のタンパク質、該タンパク質を発現する能力を有する形質転換体、形質転換体処理物、または培養液を作用させてNADPH減少初速度を測定することにより測定することができる。

## 【0010】

カルボニル還元酵素は、本明細書の記載によってそのアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列が明らかになったので、後述するようにカルボニル還元酵素のアミノ酸配列の一部又は全部をコードする塩基配列を元にして作製したプローブを用いて、カルボニル還元酵素活性を有する任意の微生物からカルボニル還元酵素をコードするDNAを単離した後、それを元に通常の遺伝子工学的手法を用いて得ることができる。

また、本発明を完成するにあたってなされたように、カルボニル還元酵素活性を有する微生物、すなわち、カルボニル還元酵素をコードするDNAを有する微生物、例えば、ブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、ホルテア (*Hortaea*) 属、イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、又は、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する微生物、好ましくはイサチェンキア (*Issatchenkia*) 属酵母の培養物より精製することも出来る。

## 【0011】

イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属酵母としては、例えば、イサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (*Issatchenkia scutulata* var. *scutulata*) JCM1828株が特に本発明のカルボニル還元酵素の産生能に優れている。本菌株は、理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorganism (JCM)) より入手可能である。

## 【0012】

微生物の培養物からのカルボニル還元酵素の取得方法としては、通常酵素の精製方法を用いることができ、例えば、以下の方法で行うことができる。上記微生物をYM培地等の酵母の培養に用いられる一般的な培地で培養することで十分に増殖させた後に回収し、DTT (dithiothreitol) 等の還元剤や、フェニルメタンスルホニルフルオリド (phenylmethanesulfonyl fluoride; PMSF) の様なプロテアーゼ阻害剤を加えた緩衝液中で破碎して無細胞抽出液とする。無細胞抽出液から、タンパク質の溶解度による分画(有機溶媒による沈殿や硫酸などによる塩析など)や、陽イオン交換、陰イオン交換、ゲル濾過、疎水、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、キレート、色素、抗体等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより精製することが出来る。

## 【0013】

例えば、DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Bioscience社製)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、Butyl Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences社製)を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィー、Mono Q (Amersham Biosciences社製)を用いた陰イオン交換クロマ

トグラフィー、Superdex 200 (Amersham Biosciences社製) を用いたゲルろ過クロマトグラフィー等を経て電気泳動的にほぼ単一バンドまで精製することが出来る。

#### 【0014】

このように精製されたイサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (*Issatchankia scutulata* var. *scutulata*) JCM1828株に由来するカルボニル還元酵素 (以下、本酵素を「ISADH1」と称することがある。) は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下、SDS-PAGEと省略) によると約40,000Daのサブユニット1種からなり、また、Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biosciences社製) を用いたゲル濾過に決定された分子量は、約40,000Daである。

#### 【0015】

カルボニル還元酵素をコードするDNAは、例えば、以下のような方法によって単離することができる。

まず、カルボニル還元酵素を上記の方法等にて精製後、N末端アミノ酸配列を解析し、さらに、リジルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼなどの酵素により切断し、逆相液体クロマトグラフィーなどによりペプチド断片を精製後、プロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を解析することにより複数のアミノ酸配列を決めることができる。

#### 【0016】

決定したアミノ酸配列を元にPCR用のプライマーを設計し、カルボニル還元酵素生産微生物株の染色体DNAもしくは、cDNAライブラリーを鋳型とし、アミノ酸配列から設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことにより本発明のDNAの一部を得ることができる。さらに、得られたDNA断片をプローブとして、カルボニル還元酵素生産微生物株の染色体DNAの制限酵素消化物をフェージ、プラスミドなどに導入し、大腸菌を形質転換して得られたライブラリーやcDNAライブラリーを利用して、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーションなどにより、カルボニル還元酵素をコードするDNAを得ることができる。

#### 【0017】

また、PCRにより得られたDNA断片の塩基配列を解析し、得られた配列から、既知のDNAの外側に伸長させるためのPCRプライマーを設計し、カルボニル還元酵素生産微生物株のcDNAを用いてRACE (Rapid amplification of cDNA ends) 法 (Molecular Cloning 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press、以下、Molecular Cloning) により本発明のDNAを得ることも可能である。

#### 【0018】

このようにしてイサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (*Issatchankia scutulata* var. *scutulata*) JCM1828株の染色体DNAから単離されたカルボニル還元酵素ISADH1をコードするDNAの塩基配列は、配列番号2に示すとおりである。

なおカルボニル還元酵素ISADH1をコードするDNAは、以上のような方法によってクローニングされたゲノムDNA、あるいはcDNAの他、本明細書に記載の通りその塩基配列が明らかになったため、配列番号2に基づく化学合成等によって得ることもできる。

#### 【0019】

ISADH1をコードするDNAのホモログとは、カルボニル基還元酵素活性を害さない範囲内において配列番号1に記載のアミノ酸配列に一個若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものである。ここで複数個とは、具体的には20個以下、好ましくは10個以下、より好ましくは5個以下である。

#### 【0020】

また、ISADH1のホモログとは、配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上のホモロジーを有するタ



ンパク質をいう。

ちなみに上記タンパク質のホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータバンク (DNA Databank of JAPAN (DDBJ)) 等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。配列番号1に記載のアミノ酸配列を用いてDDBJを対象にBLAST programを用いてホモロジー検索を行った結果、既知のタンパク質の中でもっとも高いホモロジーを示したのは、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の機能未知のタンパク質Ydr541cp protein (配列番号3: Accession No. AAB64983) であり、42%の相同性を示した。

#### 【0021】

また、ISADH1をコードするDNAは、上記ISADH1をコードするDNAまたはそのホモログであって、カルボニル還元酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

上記タンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号2で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

ISADH1をコードするDNAのホモログとは、カルボニル基還元酵素活性を害さない範囲内において配列番号1に記載のアミノ酸配列に1個もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNAを含む。ここで複数個とは、具体的には60個以下、好ましくは30個以下、より好ましくは10個以下である。

#### 【0022】

当業者であれば、配列番号2に記載のDNAに部位特異的変異導入法 (Nucleic Acids Res., vol.10, pp.6487 (1982)、Methods in Enzymol., vol.100, pp.448 (1983)、Molecular Cloning, PCR - A Practical Approach, IRL Press, pp.200 (1991)) 等を用いて適宜置換、欠失、挿入及び／または付加変異を導入することによりISADH1をコードするDNAのホモログを得ることが可能である。

#### 【0023】

また、ISADH1のアミノ酸配列またはその一部や、ISADH1をコードするDNAまたはその一部を元に、例えばDNA Databank of JAPAN (DDBJ) 等のデータベースに対してホモロジー検索を行って、本発明のタンパク質をコードするDNAホモログの塩基配列情報を手に入れることも可能である。当業者であれば、この塩基配列情報を元に寄託菌株からのPCR等により該DNA断片を手に入れることが可能である。

#### 【0024】

さらに、ISADH1をコードするDNAのホモログは、ISADH1をコードするDNAまたはその一部をプローブとして用いて、ISADH1活性を有する任意の微生物から調製したDNAに対し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等によりストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするDNAを得ることによっても取得できる。本発明のタンパク質をコードするDNAの「一部」とは、プローブとして用いるのに十分な長さのDNAのことであり、具体的には15bp以上、好ましくは50bp以上、より好ましくは100bp以上のものである。

各ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning等に記載されている方法に準じて行うことができる。

#### 【0025】

本明細書において「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、DNAをプローブとして使用し、ストリンジェントな条件下、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、ストリンジェントな条件としては、例えば、コロニーハイブリダイゼーション法およびプラークハイブリダイゼーション法においては、コロニーあるいはプラーク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下65℃でハ

イブリダイゼーションを行った後、 $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$  溶液 ( $1 \times \text{SSC}$  の組成は、 $150 \text{ mM}$  塩化ナトリウム、 $15 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウム) を用い、 $65^\circ\text{C}$  条件下でフィルターを洗浄する条件を挙げることができる。

#### 【0026】

上記のようにして単離された、カルボニル還元酵素をコードする DNA を公知の発現ベクターに発現可能に挿入することにより、カルボニル還元酵素発現ベクターが提供される。また、この発現ベクターで形質転換した形質転換体を培養することにより、カルボニル還元酵素を該形質転換体から得ることができる。あるいは、形質転換体は、公知の宿主の染色体 DNA にカルボニル還元酵素をコードする DNA を発現可能に組み込むことによっても得ることができる。

#### 【0027】

形質転換体の作製方法としては、具体的には、微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中に、本発明の DNA を導入し、構築された発現ベクターを該微生物中に導入するか、もしくは、直接宿主ゲノム中にカルボニル還元酵素をコードする DNA を導入し、その遺伝情報を転写・翻訳させる必要がある。

このとき、カルボニル還元酵素をコードする DNA が宿主微生物中で発現可能なプロモーターを含んでいない場合には、適当なプロモーターを本発明の DNA 鎖の 5' 側上流に、より好ましくはターミネーターを 3' 側下流にそれぞれ組み込む必要がある。このプロモーター及びターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター及びターミネーターであれば特に限定されず、これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター及びターミネーターなどに関しては、例えば「微生物学基礎講座 8 遺伝子工学・共立出版」、特に酵母に関しては、*Adv. Biochem. Eng.* 43, 75-102 (1990)、*Yeast* 8, 423-488 (1992) などに詳細に記述されている。

#### 【0028】

本発明のカルボニル還元酵素を発現させるための形質転換の対象となる宿主微生物としては、宿主自体が本反応に悪影響を与えない限り特に限定されることはなく、具体的には以下に示すような微生物を挙げることができる。

#### 【0029】

エシェリヒア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属などに属する宿主ベクター系の確立されている細菌。

#### 【0030】

ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属などに属する宿主ベクター系の確立されている放線菌。

#### 【0031】

サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属などに属するの宿主ベクター系の確立されている酵母。

#### 【0032】

ノイロスポラ (*Neurospora*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属などに属するの宿主ベクター系の確立されているカビ。

## 【0033】

上記微生物の中で宿主として好ましくは、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属であり、特に好ましくは、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属である。

## 【0034】

形質転換体作製のための手順、宿主に適合した組換えベクターの構築および宿主の培養方法は、分子生物学、生物学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる (例えば、Molecular Cloningに記載の方法)。

## 【0035】

以下、具体的に、好ましい宿主微生物、各微生物における好ましい形質転換の手法、ベクター、プロモーター、ターミネーターなどの例を挙げるが、本発明はこれらの例に限定されない。

## 【0036】

エシェリヒア属、特にエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) においては、プラスミドベクターとしては、pBR、pUC系プラスミドが挙げられ、lac ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)、trp (トリプトファンオペロン)、tac、trc (lac、trpの融合)、 $\lambda$ ファージPL、PRなどに由来するプロモーターなどが挙げられる。また、ターミネーターとしては、trpA由来、ファージ由来、rrnBリボソーマルRNA由来のターミネーターなどが挙げられる。

## 【0037】

バチルス属においては、ベクターとしては、pUB110系プラスミド、pC194系プラスミドなどを挙げることもでき、また、染色体にインテグレートすることもできる。プロモーター及びターミネーターとしては、アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ等の酵素遺伝子のプロモーターやターミネーターなどが利用できる。

## 【0038】

シュードモナス属においては、ベクターとしては、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*) など確立されている一般的な宿主ベクター系や、トルエン化合物の分解に関与するプラスミド、TOLプラスミドを基本にした広宿主域ベクター (RSF1010などに由来する自律的複製に必要な遺伝子を含む) pKT240 (Gene, 26, 273-82 (1983)) を挙げることもできる。

## 【0039】

ブレヴィバクテリウム属、特にブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) においては、ベクターとしては、pAJ43 (Gene 39, 281 (1985)) などのプラスミドベクターを挙げることもできる。プロモーター及びターミネーターとしては、大腸菌で使用されている各種プロモーター及びターミネーターが利用可能である。

## 【0040】

コリネバクテリウム属、特にコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) においては、ベクターとしては、pCS11 (特開昭57-183799号公報)、pCB101 (Mol. Gen. Genet. 196, 175 (1984)) などのプラスミドベクターが挙げられる。

## 【0041】

サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、特にサッカロマイセス・セレビジェ (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、ベクターとしては、YRp系、YEp系、YCp系、YIp系プラスミドが挙げられる。また、アルコール脱水素酵素、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、酸性フォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ホスホグリセレートキナーゼ、エノラーゼといった各種酵素遺伝

子のプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【0042】

シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属においては、ベクターとしては、Mol. Cell. Biol. 6, 80 (1986) に記載のシゾサッカロマイセス・ポンベ由来のプラスミドベクターを挙げることができる。特に、pAUR 224 は、宝酒造から市販されており容易に利用できる。

【0043】

アスペルギルス (*Aspergillus*) 属においては、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリジー (*Aspergillus oryzae*) などがカビの中で最もよく研究されており、プラスミドや染色体へのインテグレーションが利用可能であり、菌体外プロテアーゼやアミラーゼ由来のプロモーターが利用可能である (*Trends in Biotechnology* 7, 283-287 (1989))。

【0044】

また、上記以外でも、各種微生物に応じた宿主ベクター系が確立されており、それらを適宜使用することができる。

また、微生物以外でも、植物、動物において様々な宿主・ベクター系が確立されており、特に蚕を用いた昆虫などの動物中 (*Nature* 315, 592-594 (1985)) や菜種、トウモロコシ、ジャガイモなどの植物中に大量に異種タンパク質を発現させる系、及び大腸菌無細胞抽出液や小麦胚芽などの無細胞タンパク質合成系を用いた系が確立されており、好適に利用できる。

【0045】

本発明は、上記の方法などで得られる配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体、又は、該DNAを染色体DNAに組み込んで得られる形質転換体細胞、該形質転換体細胞処理物および／または培養液を、反応基質である2-ペンタノンあるいは2-ヘキサノンに作用させることにより、該化合物のカルボニル基を不斉還元させ、(S)-2-ペンタノールあるいは(S)-2-ヘキサノールを製造することができる。

【0046】

また本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列と50%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であって、カルボニル基を還元して光学活性アルコールを合成する能力を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体、又は、該DNAを染色体DNAに組み込んで得られる形質転換体細胞、該形質転換体細胞処理物および／または培養液を、反応基質である2-ペンタノンあるいは2-ヘキサノンに作用させることにより、該化合物のカルボニル基を不斉還元させ、(S)-2-ペンタノールあるいは(S)-2-ヘキサノールを製造することができる。

【0047】

また本発明は、ブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、ホルテア (*Hortaea*) 属、イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、又は、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する微生物、該微生物処理物および／または培養液を、反応基質である2-ペンタノンあるいは2-ヘキサノンに作用させることにより、該化合物のカルボニル基を不斉還元させ、(S)-2-ペンタノールあるいは(S)-2-ヘキサノールを製造することができる。

2-ペンタノンに作用させることにより、(S)-2-ペンタノールを製造する場合は、ブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、ホルテア (*Hortaea*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、又は、ピキア (*Pichia*) 属に属する微生物が好ましく用いられ、ブレッタノマイセス・ブルクセレンシス (*Brettanomyces br*

uxellensis)、キャンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、キャンディダ・ゼイラノイデス (*Candida zeylanoides*)、ホルテア・ウェルネッキ (*Hortaea werneckii*)、ロッデロマイセス・エロンジスポラス (*Lodderomyces elongisporus*)、ピキア・セゴビエンシス (*Pichia segobienensis*)、ピキア・スパルティナエ (*Pichia spartinae*) が特に好ましく用いられ、具体的には、ブレッタノマイセス・ブルクセレンシス (*Brettanomyces*) IFO 0629、ブレッタノマイセス・ブルクセレンシス (*Brettanomyces*) IFO 0797、キャンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*) CBS 604、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) IFO 0006、キャンディダ・ゼイラノイデス (*Candida zeylanoides*) CBS 6408、キャンディダ・ゼイラノイデス (*Candida zeylanoides*) JCM 1627、ホルテア・ウェルネッキ (*Hortaea werneckii*) IFO 4875、ロッデロマイセス・エロンジスポラス (*Lodderomyces elongisporus*) IFO 1676、ピキア・セゴビエンシス (*Pichia segobiensis*) JCM 10740、ピキア・スパルティナエ (*Pichia spartinae*) JCM 10741が好ましく用いられる。

#### 【0048】

2-ヘキサノンに作用させることにより、(S)-2-ヘキサノールを製造する場合は、キャンディダ (*Candida*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、又は、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属に属する微生物が好ましく用いられ、キャンディダ・ファマータ (*Candida famata*)、キャンディダ・シリンドラケア (*Candida cylindracea*)、キャンディダ・クルセイ (*Candida krusei*)、キャンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*)、キャンディダ・ゼイラノイデス (*Candida zeylanoides*)、デッケラ・アノマルス (*Dekkera anomala*)、イサチェンキア・スクチュラータ (*Issatchenkia scutulata*)、ロッデロマイセス・エロンジスポラス (*Lodderomyces elongisporus*)、オガタエア・ポリモーファ (*Ogataea polymorpha*)、ピキア・ベッセイ (*Pichia besseyi*)、ピキア・カクトフィラ (*Pichia cactophila*)、ピキア・セゴビエンシス (*Pichia segobienensis*)、ピキア・トレハロフィラ (*Pichia trehalophila*) 及び、ロドトルラ・ミヌータ (*Rhodotorula minuta*) が特に好ましく用いられ、具体的には、キャンディダ・ファマータ (*Candida famata*) NRRL Y-245、キャンディダ・シリンドラケア (*Candida cylindracea*) ATCC 14830、キャンディダ・クルセイ (*Candida krusei*) IFO 1664、キャンディダ・クルセイ (*Candida krusei*) JCM 2284、キャンディダ・クルセイ (*Candida krusei*) JCM 2341、キャンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) IFO 1977、キャンディダ・ゼイラノイデス (*Candida zeylanoides*) CBS 6408、デッケラ・アノマルス (*Dekkera anomala*) IFO 0627、イサチェンキア・スクチュラータ (*Issatchenkia scutulata*) JCM 1828、ロッデロマイセス・エロンジスポラス (*Lodderomyces elongisporus*) IFO 1676、オガタエア・ポリモーファ (*Ogataea polymorpha*) IFO 1024、オガタエア・ポリモーファ (*Ogataea polymorpha*) IFO 1071、ピキア・ベッセイ (*Pichia besseyi*) JCM 1706、ピキア・カクトフィラ (*Pichia cactophila*) JCM 1830、ピキア・セゴビエンシス (*Pichia segobienensis*) JCM 10740、ピキア・トレハロフィラ (*Pichia trehalophila*) JCM 3651及び、ロドトルラ・ミヌータ (*Rhodotorula minuta*) IFO 0879が好ましく用いられる。

#### 【0049】

また、反応基質となる2-ペンタノンあるいは2-ヘキサノンは、通常、基質濃度が0.01~90% w/v、好ましくは0.1~30% w/vの範囲で用いられる。反応基質は、反応開始時に一括して添加しても良いが、酵素の基質阻害があった場合の影響を減らすと言う点や生成物の蓄積濃度を向上させるという観点からすると、連続的もしくは間欠的に添加することが望ましい。

#### 【0050】

本発明の製造方法において、2-ペンタノンあるいは2-ヘキサノンのカルボニル基含有化合物(反応基質)に上記形質転換体細胞又はカルボニル還元活性を有する微生物を作用させるに当たっては、該形質転換体細胞又は微生物細胞をそのまま、あるいは該細胞処理物、例えば、該細胞をアセトン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、トルエン等の有

機溶媒や界面活性剤により処理したもの、凍結乾燥処理したもの、物理的または酵素的に破碎したものの等の細胞処理物、該細胞中のカルボニル還元酵素画分を粗製物あるいは精製物として取り出したもの、さらには、これらをポリアクリルアミドゲル、カラギーナンゲル等に代表される担体に固定化したもの等を用いることができる。反応液に添加する形質転換体細胞若しくは微生物細胞及び／又は該細胞処理物の量は、反応液にその細胞の濃度が通常、湿菌体重で0.1～50%w/v程度、好ましくは1～20%w/vとなるように添加し、酵素のような調製物を用いる場合には、酵素の比活性を求め、添加したときに上記細胞濃度になるような量を添加する。

#### 【0051】

また、本発明の製造方法においては、補酵素NADP<sup>+</sup>もしくはNADPHを添加するのが好ましく、通常0.001mM～100mM、好ましくは0.01～10mM添加する。

上記補酵素を添加する場合には、NADPHから生成するNADP<sup>+</sup>をNADPHへ再生させることが生産効率向上のため好ましく、再生方法としては、1) 宿主微生物自体のNADP<sup>+</sup>還元能を利用する方法、2) NADP<sup>+</sup>からNADPHを生成する能力を有する微生物やその処理物、あるいは、グルコース脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素、有機酸脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素など）などのNADPHの再生に利用可能な酵素（再生酵素）を反応系内に添加する方法、3) 形質転換体を製造するに当たり、NADPHの再生に利用可能な酵素である上記再生酵素類の遺伝子を本発明のDNAと同時に宿主に導入する方法、が挙げられる。

#### 【0052】

このうち、上記1)の方法においては、反応系にグルコースやエタノール、ギ酸などを添加する方が好ましい。

また、上記2)の方法においては、上記再生酵素類を含む微生物、該微生物菌体をアセトン処理したもの、凍結乾燥処理したもの、物理的または酵素的に破碎したものの等の菌体処理物、該酵素画分を粗製物あるいは精製物として取り出したもの、さらには、これらをポリアクリルアミドゲル、カラギーナンゲル等に代表される担体に固定化したもの等を用いてもよく、また市販の酵素を用いても良い。

この場合、上記再生酵素の使用量としては、具体的には、本発明のカルボニル還元酵素に比較して、酵素活性で通常0.01～100倍、好ましくは0.5～20倍程度となるよう添加する。

また、上記再生酵素の基質となる化合物、例えば、グルコース脱水素酵素を利用する場合のグルコース、ギ酸脱水素酵素を利用する場合のギ酸、アルコール脱水素酵素を利用する場合のエタノールもしくはイソプロパノールなどの添加も必要となるが、その添加量としては、反応原料であるカルボニル基含有化合物に対して、通常0.1～20倍モル当量、好ましくは1～5倍モル当量添加する。

#### 【0053】

また、上記3)の方法においては、カルボニル還元酵素をコードするDNAと上記再生酵素類のDNAを染色体に組み込む方法、単一のベクター中に両DNAを導入し、宿主を形質転換する方法及び両DNAをそれぞれ別個にベクターに導入した後に宿主を形質転換する方法を用いることができるが、両DNAをそれぞれ別個にベクターに導入した後に宿主を形質転換する方法の場合、両ベクター同士の不和合性を考慮してベクターを選択する必要がある。

単一のベクター中に複数の遺伝子を導入する場合には、プロモーター及びターミネーターなど発現制御に関わる領域をそれぞれの遺伝子に連結する方法やラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させることも可能である。

#### 【0054】

本発明の製造方法は、反応基質及びカルボニル還元酵素をコードするDNAを発現させた形質転換体細胞、該細胞処理物および／または培養液、並びに、必要に応じて添加された各種補酵素及びその再生システムを含有する水性媒体中もしくは該水性媒体と有機溶媒

との混合物中で行われる。

また、本発明の製造方法は、反応基質及びブレッタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、ホルテア (*Hortaea*) 属、イサチエンキア (*Issatchenkia*) 属、ロッデロマイセス (*Lodderomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、又は、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属のカルボニル還元酵素活性を有する微生物、該微生物処理物および／または培養液、並びに、必要に応じて添加された各種補酵素及びその再生システムを含有する水性媒体中もしくは該水性媒体と有機溶媒との混合物中で行われる。

上記、水性媒体としては、水又は緩衝液が挙げられ、また、有機溶媒としては、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、*n*-ヘキサン、ジメチルスルホキシド等、反応基質の溶解度が高い物を使用することができる。

本発明の方法は、通常 4～60℃、好ましくは 10～45℃の反応温度で、通常 pH 3～11、好ましくは pH 5～8で行われる。反応時間は通常、1～72時間程度である。また、膜リアクターなどを利用して行うことも可能である。

#### 【0055】

本発明の方法により生成する光学活性アルコールは、反応終了後、反応液中の菌体やタンパク質を遠心分離、膜処理などにより分離した後に、酢酸エチル、トルエンなどの有機溶媒による抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、晶析等を適宜組み合わせることにより精製を行うことができる。

#### 【実施例】

##### 【0056】

次に、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例の記載に限定されるものではない。

##### 【0057】

(1) 2-ペンタノンから (S)-2-ペンタノールあるいは 2-ヘキサノンから (S)-2-ヘキサノールを生成する微生物の単離

イーストエキス (Difco社製) 5g/L、ポリペプトン (日本製薬社製) 5g/L、麦芽エキス (Difco社製) 3g/L、グルコース (日本食品加工社製) 20g/Lの組成からなる液体培地 2.5mLに、表1に示した各種の菌株を接種し、30℃で24から72時間好氣的に培養した。得られた培養液を1mLづつとり遠心分離し、菌体を集めた。この菌体にトリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) を0.04mL、脱塩水を280mL加え菌体を十分に懸濁させたのちに、グルコース 100g/Lを0.05mL、NADP 12g/Lを0.02mL、イソプロパノールに100g/Lとなるように溶かした2-ペンタノンあるいは2-ヘキサノンを0.01mL加え30℃で20時間反応させた。

##### 【0058】

反応終了後の反応液を酢酸エチル抽出し、(S)-2-ペンタノールあるいは (S)-2-ヘキサノールの定量を行った。定量は、酢酸エチル溶液をガスクロマトグラフィー (GC) を用いて測定した。GCの条件は以下の通りである。

##### 【0059】

カラム:  $\beta$ -DEX 120 (SUPELCO社製、30m×0.25mm ID、0.25  $\mu$ m film)

キャリア: He 1.5ml/min、split 1/50

カラム温度: (S)-2-ペンタノールの定量時は50℃、(S)-2-ヘキサノールの定量時は65℃

注入温度: 250℃

検出: FID 250℃

GC: 島津GC-14A

##### 【0060】

(S)-2-ペンタノールの定量結果を表1に、(S)-2-ヘキサノールの定量結果

を表 2 に示す。

【 0 0 6 1 】

【表 1】

表 1 2-ペンタノンから(S)-2-ペンタノールの生成

菌株		生成物濃度 (g/L)	生成物光学純度 (% e.e.)	
<u>Brettanomyces bruxellensis</u>	IFO0629	1.07	100	s
<u>Brettanomyces bruxellensis</u>	IFO0797	1.18	100	s
<u>Candida parapsilosis</u>	CBS 604	1.70	100	s
<u>Candida tropicalis</u>	IFO 0006	1.17	100	s
<u>Candida zeylanoides</u>	CBS 6408	1.36	100	s
<u>Candida zeylanoides</u>	JCM1627	1.45	100	s
<u>Hortaea werneckii</u>	IFO 4875	1.34	100	s
<u>Lodderomyces elongisporus</u>	IFO 1676	1.25	100	s
<u>Pichia segobiensis</u>	JCM10740	1.16	100	s
<u>Pichia spartinae</u>	JCM10741	1.48	100	s

【 0 0 6 2 】



【表 2】

表 2 2-ヘキサノンから(S)-2-ヘキサノールの生成

菌株		生成物濃度 (g/L)	生成物光学純度 (% e.e.)	
<u>Candida cylindracea</u>	ATCC 14830	1.15	90.2	s
<u>Candida famata</u>	NRRL Y-245	1.20	93.0	s
<u>Candida krusei</u>	IFO 1664	1.10	100	s
<u>Candida krusei</u>	JCM 2284	0.68	100	s
<u>Candida krusei</u>	JCM 2341	0.88	100	s
<u>Candida maltosa</u>	IFO 1977	1.48	100	s
<u>Candida zeylanoides</u>	CBS 6408	1.51	100	s
<u>Dekkera anomalus</u>	IFO 0627	1.23	100	s
<u>Issatchenkia scutulata</u> var. <u>scutulata</u>	JCM 1828	1.07	91.8	s
<u>Lodderomyces elongisporus</u>	IFO 1676	1.58	100	s
<u>Ogataea polymorpha</u>	IFO 1024	1.16	100	s
<u>Ogataea polymorpha</u>	IFO 1071	0.94	100	s
<u>Pichia besseyi</u>	JCM1706	0.97	84.5	s
<u>Pichia cactophila</u>	JCM1830	1.30	93.9	s
<u>Pichia segobiensis</u>	JCM10740	1.48	100	s
<u>Pichia trehalophila</u>	JCM3651	1.16	100	s
<u>Rhodotorula minuta</u>	IFO 0879	0.92	100	s

## 【0063】

(2) イサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ JCM1828 株由来カルボニル還元酵素の単離

イサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (Issatchankia scutulata var. scutulata) JCM1828 株を 2 L の培地 (グルコース 80 g、酵母エキス (Difco 社製) 20 g、ペプトン (極東製薬製) 40 g/L) で培養し、遠心分離により菌体を調製した。得られた湿菌体 150 g を 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7)、0.1 mM DTT (以下これを単に「バッファー」と称する) で懸濁し、ダイノーミル KDL (シンマルエンタープライゼス製) により破碎後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液に 90 g/L の濃度になるよう PEG 6000 を添加し 4℃ で 1 時間静置後、遠心分離により沈殿を除去した。この上清より、DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences 社製) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、Butyl Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences 社製) を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィー、Mono Q (Amersham Biosciences 社製) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、及び Superdex 200 (Amersham Biosciences 社製) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを経て目的のカルボニル還元酵素を電気泳動的に単一バンドまで精製した。

## 【0064】

精製の際、カルボニル還元酵素の活性は、酵素液を含む反応液 (100 mM Tris-HCl pH 7.5、0.32 mM NADPH、2 mM 1-アセトキシ-3-クロ

ロー 2-プロパノン) の 340 nm の吸光度の減少を 37℃ でモニターすることにより NADPH の消費量を算出することにより測定した。測定には SPECTRAmax 190 (Molecular Devices 社製) を使用した。尚、上記反応において 1 分に 1 nmol の NADPH を消費する活性を 1 U とした。

精製の結果を下表 1 に示す。

【0065】

【表 3】

表 3

精製段階	総活性 (U)	総蛋白量 (mg)	比活性 (U/mg)	精製倍率	収率 (%)
無細胞抽出液	1360	16800	0.0810	1	100.0
PEG6000 上清	693	4680	0.148	1.83	51.0
DEAE Sepharose FF	857	266.0	3.22	39.8	63.0
Butyl Sepharose 4 FF	488	10.6	46.0	569	35.9
MonoQ	592	3.11	190	2351	43.5
Superdex200	348	1.038	335	4141	25.6

【0066】

上記活性画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により解析した結果、ほぼ単一バンドであり、その分子量は約 40,000 Da であった。以下、本酵素を IsADH1 と呼ぶ。

【0067】

(3) IsADH1 の基質特異性

様々なカルボニル化合物について酵素液を含む反応液 (100 mM Tris-HCl pH 7.5、0.32 mM NADPH、2 mM 基質) を調製し、340 nm の吸光度の減少を 37℃ でモニターすることによりそれぞれの化合物に対する酵素活性を測定した。測定には SPECTRAmax 190 (Molecular Devices 社製) を使用した。1-アセトキシ-3-クロロ-2-プロパノンに対する活性を 100 とし、他の化合物に対する活性を下表 2 にまとめた。

【0068】

【表 4】

表4

基質	相対活性
1-アセトキシ-3-クロロ-2-プロパノン	100
4-クロロ-3-オキシ酪酸エチル	212
3-オキシ酪酸エチル	25.5
アセトイン	—
ジアセチル	—
2, 3-ペンタジオン	trace
ビルビン酸エチル	trace
3-メチル-2-オキシ酪酸エチル	trace
アセトフェノン	—
プロピオフェノン	trace
フェノキシアセトン	—
3-プロピオニルピリジン	11.2
2, 2, 2-トリフルオロアセトフェノン	53.8
フェニルビルビン酸	12.2
ベンゾイル酢酸エチル	trace
ニコチノイル酢酸エチル	20.7
p-ヒドロキシベンズアルデヒド	—
p-クロロベンズアルデヒド	58.0
2-ノルボルナノン	—
3-キヌクリジノン	trace

—; 活性検出できず

trace; 微活性あり

## 【0069】

(4) IsADH1のアミノ酸配列の解析

前記(2)で得られたカルボニル還元酵素を含む画分を脱塩、濃縮後、エドマン法によりN末端アミノ酸の解析を行い18残基のN末端アミノ酸配列を決定した。結果を配列番号4に示す。

また、精製したカルボニル還元酵素を、リジルエンドペプチダーゼを用いた消化法(タンパク質実験ノート・下、羊土社)により消化して得たペプチドを逆相HPLC(アマシヤム バイオサイエンス社製  $\mu$ RPC C2/C18 PC3.2/3)を用い、ペプチドを分離し、分取した。分取したペプチドピーク1種をエドマン法によりアミノ酸配列の解析を行い、アミノ酸配列を配列番号5に示した。

## 【0070】

(5) IsADH1をコードするDNAの配列解析及び形質転換体の作製

イサチエンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (*Issatchankia scutulata* var. *scutulata*) JCM1828株を前記(2)に示した培地で培養し、菌体を調製した。

菌体からのゲノムDNAをDNeasy tissue kit (Qiagen社製)を用いて抽出、精製した。得られたゲノムDNAを元に、逆転写酵素SuperScript II Reverse Transcriptase (インビトロジェン社製)を用いて、酵素添付のプロトコルによりcDNAを合成した。

## 【0071】

前記(4)で得られた配列番号4のN末端アミノ酸配列を元にセンスデジェネレート(

degenerate) プライマー及び配列番号5の内部アミノ酸配列を元にアンチセンスのデジェネレート (degenerate) プライマーを計2種類合成した。それぞれの塩基配列を配列番号6, 7に示した。この2種のプライマーを用いて、イサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (*Issatchankia scutulata* var. *scutulata*) JCM1828株のcDNAに対してデジェネレート (degenerate) PCRを行ったところ、約350bpの増幅断片が認められた。

#### 【0072】

このDNA断片を、アガロースゲル電気泳動を行い、約350bpの断片のバンドを切り出しMinElute Gel Extraction Kit (Qiagen社製) にて精製して回収した。得られたDNA断片を、pGEM-Teasy Vector (Promega社製) にライゲーションし、大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (東洋紡社製) を形質転換した。形質転換株を、アンピシリン (100 $\mu$ g/mL) を含むLB寒天培地で生育させ、いくつかのコロニーを用いて、T7プライマー (Promega社製) とSP6プライマー (Promega社製) を用いたコロニーダイレクトPCRを行い、挿入断片のサイズを確認した。目的とするDNA断片が挿入されていると考えられるコロニーを、100 $\mu$ g/mLアンピシリンを含むLB培地で培養し、QIAprep Spin Mini Prep kit (Qiagen社製) によりプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを用いて、挿入DNAの塩基配列をダイターミネーター法により解析した。決定された塩基配列を配列番号8として示した。

#### 【0073】

次に、イサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (*Issatchankia scutulata* var. *scutulata*) JCM1828株のゲノムDNAを元に、Molecular cloning記載の方法に従ってRACE反応用のcDNAを合成し、同文献記載の方法で5'-及び3'-RACE反応を行った。反応には上記塩基配列を元に設計した配列番号9および10に示す2種の遺伝子特異的プライマーを用いた。

#### 【0074】

RACE反応による増幅遺伝子断片の配列解析の結果、本カルボニル還元酵素の推定cDNA配列を配列番号11に、該DNAがコードするアミノ酸配列を配列番号1に示した。配列番号1のアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号2に示した。

#### 【0075】

引き続き、上記配列番号11に記載の配列を元に、クローニング用のプライマーとして配列番号12に記載の塩基配列及び配列番号13に記載の塩基配列を合成し、上記プライマーを各50pmol、dNTP各1000nmol、イサチェンキア・スクチュラータ変種スクチュラータ (*Issatchankia scutulata* var. *scutulata*) JCM1828株のcDNA 250ng、ExTaq DNA polymerase用10 $\times$ 緩衝液 (タカラバイオ社製) 10 $\mu$ L、ExTaq DNA polymerase 5ユニット (タカラバイオ社製) を含む100 $\mu$ Lの反応液を用い、変性 (95 $^{\circ}$ C、1分)、アニール (58 $^{\circ}$ C、1分)、伸長 (72 $^{\circ}$ C、1分) を30サイクル、PTC-200 (MJ Research社製) を用いて行った。PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、特異的と思われるバンドが検出できた。

#### 【0076】

上記反応液をMinElute PCR Purification kit (Qiagen社製) にて精製した。精製したDNA断片を制限酵素EcoRIとXbaIで消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分の断片を切り出し、Qiagen Gel Extraction kit (Qiagen社製) により精製後回収した。得られたDNA断片を、EcoRI、及びXbaIで消化したpUC118とLigation high (東洋紡績社製) を用いて、ライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換した。

形質転換体をアンピシリン (50 $\mu$ g/mL) を含むLB寒天培地上で生育させ、コロニーダイレクトPCRを行い、挿入断片のサイズを確認した。

目的とするDNA断片が挿入されていると考えられる形質転換体を $50\mu\text{g/mL}$ のアンピシリンを含むLB培地で培養し、QIA Prep Spin Mini Prep kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを精製し、pUCIsADH1とした。

プラスミドに挿入したDNAの塩基配列をダイナーミネーター法により解析したところ、挿入されたDNA断片は、配列番号2の塩基配列と一致した。

#### 【0077】

(6) IsADH1をコードするDNAによって形質転換した大腸菌を用いた(S)-2-ペンタノールの合成

前記(5)で得られた形質転換体をアンピシリン( $50\mu\text{g/mL}$ )を含むCircle Grow培地100mL(BIO 101社製)を10連で $30^\circ\text{C}$ で30時間培養した。得られた菌体を遠心分離により集菌後、下記に示す方法により、2-ペンタノンを基質として(S)-2-ペンタノールの合成を行った。

#### 【0078】

上記菌体10gに $0.6\text{g/L}$  NADP<sup>+</sup>(オリエンタル酵母社製)20mg、1M トリス塩酸バッファー(pH7.0)10mL、 $100\text{g/L}$  グルコース 40mL、グルコースデヒドロゲナーゼ(天野製薬社製、 $76\text{unit/mg}$ ) 20mg、2-ペンタノン(東京化成社製、ニート)1gを添加後 $30^\circ\text{C}$ で8時間反応させた。反応時のpHを2M 炭酸ナトリウムで7.0に保った。反応終了後の反応液を酢酸エチル抽出し、生成した(S)-2-ペンタノールの定量を行った。

#### 【0079】

定量は酢酸エチル溶液をガスクロマトグラフィー(GC)を用いて測定した。GCの条件は以下の通りである。

カラム:  $\beta$ -DEX120 (SUPELCO社製、 $30\text{m}\times 0.25\text{mm ID}$ 、 $0.25\mu\text{m film}$ )

キャリア: He  $1.5\text{mL/min}$ 、split 1/50

カラム温度:  $50^\circ\text{C}$

注入温度:  $250^\circ\text{C}$

検出: FID  $250^\circ\text{C}$

GC: 島津GC-14A

#### 【0080】

この結果、(S)-2-ペンタノールの収量は $0.99\text{g}$ であり、光学純度は $>99\%$  e. e. であった。

#### 【0081】

(7) IsADH1をコードするDNAによって形質転換した大腸菌を用いた(S)-2-ヘキサノールの合成。

前記(6)で得られた形質転換体を用い下記に示す方法により、2-ヘキサノンを基質として(S)-2-ヘキサノールの合成を行った。

#### 【0082】

上記菌体10gに $0.6\text{g/L}$  NADP<sup>+</sup>(オリエンタル酵母社製)20mg、1M トリス塩酸バッファー(pH7.0)10mL、 $100\text{g/L}$  グルコース 40mL、グルコースデヒドロゲナーゼ(天野製薬社製、 $76\text{unit/mg}$ ) 20mg、2-ヘキサノン(東京化成社製、ニート)1gを添加後 $30^\circ\text{C}$ で6時間反応させた。反応時のpHを2M 炭酸ナトリウムで7.0に保った。反応終了後の反応液を酢酸エチル抽出し、生成した(S)-2-ヘキサノールの定量を行った。

#### 【0083】

定量は酢酸エチル溶液をガスクロマトグラフィー(GC)を用いて測定した。GCの条件は以下の通りである。

カラム:  $\beta$ -DEX120 (SUPELCO社製、 $30\text{m}\times 0.25\text{mm ID}$ 、 $0.25\mu\text{m film}$ )

キャリア: He  $1.5\text{mL/min}$ 、split 1/50

カラム温度: 65℃

注入温度: 250℃

検出: FID 250℃

GC: 島津 GC-14A

【0084】

この結果、(S)-2-ヘキサノールの収量は0.99 gであり、光学純度は>99% e. e. であった。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; API Corporation

&lt;120&gt; The method for manufacturing (S)-2-pentanol or (S)-2-hexanol

&lt;130&gt; J11357

&lt;160&gt; 13

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Issatchenkia scutulata

&lt;400&gt; 1

```

Met Ser Asn Lys Thr Val Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly Phe Ile Ala
1          5          10          15
Leu His Ile Ile Asp Asn Leu Leu Ser Lys Gly Tyr Ser Val Ile Gly
          20          25          30
Thr Ala Arg Ser Gln Ser Lys Tyr Gln Pro Ile Leu Asp Ala Phe Lys
          35          40          45
Lys Lys Tyr Pro Asp Ala Asn Leu Thr Phe Glu Val Val Pro Asp Ile
          50          55          60
Ser Thr Glu Asn Ala Phe Asp Asp Val Leu Lys Lys His Pro Glu Ile
65          70          75          80
Thr Ala Val Leu His Thr Ala Ser Pro Phe Ser Phe Gly Leu Asn Lys
          85          90          95
Asp Leu Lys Glu Ala Tyr Leu Lys Pro Ala Val Asp Gly Thr Leu Asn
          100          105          110
Ile Leu Lys Ala Ile Glu Lys Tyr Ala Pro Gln Val Thr Lys Val Val
          115          120          125
Ile Thr Ser Ser Tyr Ala Ala Ile Met Thr Gly Asn Pro Ser His Val
          130          135          140
His Thr Ser Glu Thr Trp Asn Pro Ile Asn Trp Glu Asn Asp Val Lys
          145          150          155          160
Asn Glu Tyr Phe Ala Tyr Ile Ala Ser Lys Thr Tyr Ala Glu Lys Ala
          165          170          175
Ala Arg Asp Phe Val Lys Glu His Lys Val Asn Phe Lys Leu Ala Thr
          180          185          190
Val Asn Pro Pro Tyr Val Leu Gly Pro Gln Leu Phe Asp Phe Ser Val
          195          200          205
Gly Pro Val Leu Asn Thr Ser Asn Gln Leu Ile Thr Asp Ala Thr Lys
          210          215          220
Ile Asp Lys Asn Ser Thr Lys Pro Glu Leu Gly Thr Pro Ala Leu Ala
          225          230          235          240
Val Asp Val Arg Asp Val Ala Ala Phe His Val Leu Pro Leu Glu Asp
          245          250          255
Asp Lys Val Ala Ser Glu Arg Leu Phe Ile Val Ala Gly Pro Ala Val
          260          265          270
Val Gln Thr Phe Leu Asn Ile Ile Asn Glu Asn Ile Pro Glu Leu Lys
          275          280          285
Gly Lys Val Ala Leu Gly Asp Pro Ala Ser Glu Lys Glu Leu Ile Glu

```

290                      295                      300  
 Lys His Thr Asp Lys Tyr Asp Leu Thr Asn Leu His Asn Val Ile Gly  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Tyr Asp Phe Ile Pro Val Glu Lys Ser Val Val Asp Val Leu Glu  
                     325                      330                      335  
 Gln Tyr Tyr Lys Ile Asn Lys Ile Asp  
                     340                      345

<210> 2  
 <211> 1038  
 <212> DNA  
 <213> Issatchenkia scutulata  
 <400> 2

atgtcgaaca aaacagttct agtcaccggg gctaccgggt ttattgcact acacatcatt 60  
 gataatttat tgtctaaggg ttattccgtt attggtacag ctagatccca atctaaatat 120  
 caaccaatcc ttgatgcttt caagaaaaaa taccctgatg caaatitgac ttttgaagtt 180  
 gtccctgaca tctccactga aaacgcattc gatgatgttt tgaagaagca tccagaaatt 240  
 actgctgtcc ttcacacagc atctccattc tcttttgggt tgaacaagga tctgaaggaa 300  
 gcatatttga agcctgccgt tgatgggtact ttgaatatc tcaaggcaat tgagaagtat 360  
 gcaccacagg ttactaaagt tgttatcaca tcttcttatg ctgcaattat gacaggtaat 420  
 ccaagtcag tccacaccag tgaaacctgg aaccctaata attgggaaaa cgatgtgaag 480  
 aatgaatact ttgcatatat tgcctccaag acgtatgctg aaaaagctgc gagagatttt 540  
 gtcaaggagc ataagggtcaa tttcaagtta gcaactgtta acccaccata cgttctgggt 600  
 ccacaattat ttgacttctc agttgggtcca gtcttgaaca cttccaacca attgatcacg 660  
 gatgcgacta aaattgataa gaactctact aagccggaat taggtacacc agcttttagca 720  
 gtcgatgtta gagatgttgc tgcgttccat gttttaccat tggaagatga taaagttgca 780  
 agtgaaagat tatttattgt tgctgggtcca gcagttgttc aaacattctt aaacatcatc 840  
 aacgagaaca ttccagaact taaaggtaag gttgccctag gagatccagc ttcagagaag 900  
 gagttgattg aaaagcacac agataagtat gatttgacaa atcttcacaa cgttattgggt 960  
 aaatatgatt tcattccagt tgaaaagtcc gttgtcgacg tcttagaaca atattacaaa 1020  
 atcaataaaa ttgattag 1038

<210> 3  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> Saccharomyces cerevisiae  
 <400> 3

Met Ser Asn Thr Val Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Phe Ile Ala Leu  
 1                      5                      10                      15  
 His Ile Leu Ser Gln Leu Leu Lys Gln Asp Tyr Lys Val Ile Gly Thr  
                     20                      25                      30  
 Val Arg Ser His Glu Lys Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln Phe Gln His  
                     35                      40                      45  
 Asn Pro Asn Leu Thr Leu Glu Ile Val Pro Asp Ile Ser His Pro Asn  
                     50                      55                      60  
 Ala Phe Asp Lys Val Leu Gln Lys Arg Gly Arg Glu Ile Arg Tyr Val  
 65                      70                      75                      80  
 Leu His Thr Ala Ser Pro Phe His Tyr Asp Thr Thr Glu Tyr Glu Lys  
                     85                      90                      95  
 Asp Leu Leu Ile Pro Ala Leu Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Asn Ser



100 105 110  
 Ile Lys Lys Tyr Ala Ala Asp Thr Val Glu Arg Val Val Val Thr Ser  
 115 120 125  
 Ser Cys Thr Ala Ile Ile Thr Leu Ala Lys Met Asp Asp Pro Ser Val  
 130 135 140  
 Val Phe Thr Glu Glu Ser Trp Asn Glu Ala Thr Trp Glu Ser Cys Gln  
 145 150 155 160  
 Ile Asp Gly Ile Asn Ala Tyr Phe Ala Ser Lys Lys Phe Ala Glu Lys  
 165 170 175  
 Ala Ala Trp Glu Phe Thr Lys Glu Asn Glu Asp His Ile Lys Phe Lys  
 180 185 190  
 Leu Thr Thr Val Asn Pro Ser Leu Leu Phe Gly Pro Gln Leu Phe Asp  
 195 200 205  
 Glu Asp Val His Gly His Leu Asn Thr Ser Cys Glu Met Ile Asn Gly  
 210 215 220  
 Leu Ile His Thr Pro Val Asn Ala Ser Val Pro Asp Phe His Ser Ile  
 225 230 235 240  
 Phe Ile Asp Val Arg Asp Val Ala Leu Ala His Leu Tyr Ala Phe Gln  
 245 250 255  
 Lys Glu Asn Thr Ala Gly Lys Arg Leu Val Val Thr Asn Gly Lys Phe  
 260 265 270  
 Gly Asn Gln Asp Ile Leu Asp Ile Leu Asn Glu Asp Phe Pro Gln Leu  
 275 280 285  
 Arg Gly Leu Ile Pro Leu Gly Lys Pro Gly Thr Gly Asp Gln Val Ile  
 290 295 300  
 Asp Arg Gly Ser Thr Thr Asp Asn Ser Ala Thr Arg Lys Ile Leu Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Glu Phe Arg Ser Leu His Glu Ser Val His Asp Thr Ala Ala Gln  
 325 330 335  
 Ile Leu Lys Lys Glu Asn Arg Leu  
 340

<210> 4  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Issatchenkia scutulata  
 <400> 4

Arg Asn Lys Thr Val Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly Phe Ile Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Ile

<210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Issatchenkia scutulata  
 <400> 5

Val Val Ile Thr Ser Ser Tyr Ala Ala Ile Met Thr Gly Asn Pro  
 1 5 10 15

<210> 6  
 <211> 23

<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> PCR primer  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> n; inosine  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> n; inosine  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> n; inosine  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(18)  
<223> n; inosine  
<400> 6acnggnttya thgcnytnga yat

23

<210> 7  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> PCR primer  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> n; inosine  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)<223> n; inosine  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(18)  
<223> n; inosine  
<220><221> misc\_feature  
<222> (21)..(21)  
<223> n; inosine  
<400> 7  
ggrttncng tcatdatngc ngcrta

26

<210> 8  
<211> 341  
<212> DNA  
<213> Issatchenkia scutulata  
<400> 8

cattgataat ttattgtcta agggttattc cgttattggt acagctagat cccaatctaa 60  
 atatcaacca atccttgatg ctttcaagaa aaaataccct gatgcaaatt tgacttttga 120  
 agttgtccct gacatctcca ctgaaaacgc attcgatgat gttttgaaga agcatccaga 180  
 aattactgct gtccttcaca cagcatctcc attctctttt ggtttgaaca aggatctgaa 240  
 ggaagcatat ttgaagcctg ccgttgatgg tactttgaat attctcaagg caattgagaa 300  
 gtatgcacca caggttacta aagttgttat cacatcttct t 341

<210> 9  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> PCR primer  
 <400> 9

agggttattc cgttattggt acagctag

28

<210> 10  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> PCR primer  
 <400> 10

gagaatggag atgctgtgtg aaggacagca g

31

<210> 11  
 <211> 1212  
 <212> DNA  
 <213> Issatchenkia scutulata  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (55)..(1092)  
 <223>  
 <400> 11

tcatgacctg tccactgata gcatcatacc aaacatattc agtatattgt aaca atg 57  
 Met

1  
 tcg aac aaa aca gtt cta gtc acc ggg gct acc ggt ttt att gca cta 105  
 Ser Asn Lys Thr Val Leu Val Thr Gly Ala Thr Gly Phe Ile Ala Leu

5 10 15  
 cac atc att gat aat tta ttg tct aag ggt tat tcc gtt att ggt aca 153  
 His Ile Ile Asp Asn Leu Leu Ser Lys Gly Tyr Ser Val Ile Gly Thr

20 25 30  
 gct aga tcc caa tct aaa tat caa cca atc ctt gat gct ttc aag aaa 201  
 Ala Arg Ser Gln Ser Lys Tyr Gln Pro Ile Leu Asp Ala Phe Lys Lys

35 40 45  
 aaa tac cct gat gca aat ttg act ttt gaa gtt gtc cct gac atc tcc 249  
 Lys Tyr Pro Asp Ala Asn Leu Thr Phe Glu Val Pro Asp Ile Ser

50 55 60 65  
 act gaa aac gca ttc gat gat gtt ttg aag aag cat cca gaa att act 297

Thr	Glu	Asn	Ala	Phe	Asp	Asp	Val	Leu	Lys	Lys	His	Pro	Glu	Ile	Thr	
				70					75					80		
gct	gtc	ctt	cac	aca	gca	tct	cca	ttc	tct	ttt	ggt	ttg	aac	aag	gat	345
Ala	Val	Leu	His	Thr	Ala	Ser	Pro	Phe	Ser	Phe	Gly	Leu	Asn	Lys	Asp	
			85					90					95			
ctg	aag	gaa	gca	tat	ttg	aag	cct	gcc	gtt	gat	ggt	act	ttg	aat	att	393
Leu	Lys	Glu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Thr	Leu	Asn	Ile	
		100					105					110				
ctc	aag	gca	att	gag	aag	tat	gca	cca	cag	gtt	act	aaa	gtt	gtt	atc	441
Leu	Lys	Ala	Ile	Glu	Lys	Tyr	Ala	Pro	Gln	Val	Thr	Lys	Val	Val	Ile	
		115				120					125					
aca	tct	tct	tat	gct	gca	att	atg	aca	ggt	aat	cca	agt	cat	gtc	cac	489
Thr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ile	Met	Thr	Gly	Asn	Pro	Ser	His	Val	His	
130					135					140				145		
acc	agt	gaa	acc	tgg	aac	cca	att	aat	tgg	gaa	aac	gat	gtg	aag	aat	537
Thr	Ser	Glu	Thr	Trp	Asn	Pro	Ile	Asn	Trp	Glu	Asn	Asp	Val	Lys	Asn	
				150					155				160			
gaa	tac	ttt	gca	tat	att	gcc	tcc	aag	acg	tat	gct	gaa	aaa	gct	gcg	585
Glu	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	
			165					170				175				
aga	gat	ttt	gtc	aag	gag	cat	aag	gtc	aat	ttc	aag	tta	gca	act	gtt	633
Arg	Asp	Phe	Val	Lys	Glu	His	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Leu	Ala	Thr	Val	
		180					185					190				
aac	cca	cca	tac	gtt	ctg	ggt	cca	caa	tta	ttt	gac	ttc	tca	gtt	ggt	681
Asn	Pro	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Leu	Phe	Asp	Phe	Ser	Val	Gly	
		195				200					205					
cca	gtc	ttg	aac	act	tcc	aac	caa	ttg	atc	acg	gat	gcg	act	aaa	att	729
Pro	Val	Leu	Asn	Thr	Ser	Asn	Gln	Leu	Ile	Thr	Asp	Ala	Thr	Lys	Ile	
210					215					220				225		
gat	aag	aac	tct	act	aag	ccg	gaa	tta	ggt	aca	cca	gct	tta	gca	gtc	777
Asp	Lys	Asn	Ser	Thr	Lys	Pro	Glu	Leu	Gly	Thr	Pro	Ala	Leu	Ala	Val	
				230					235				240			
gat	gtt	aga	gat	gtt	gct	gcg	ttc	cat	gtt	tta	cca	ttg	gaa	gat	gat	825
Asp	Val	Arg	Asp	Val	Ala	Ala	Phe	His	Val	Leu	Pro	Leu	Glu	Asp	Asp	
			245					250				255				
aaa	gtt	gca	agt	gaa	aga	tta	ttt	att	gtt	gct	ggt	cca	gca	gtt	gtt	873
Lys	Val	Ala	Ser	Glu	Arg	Leu	Phe	Ile	Val	Ala	Gly	Pro	Ala	Val	Val	
		260					265					270				
caa	aca	ttc	tta	aac	atc	atc	aac	gag	aac	att	cca	gaa	ctt	aaa	ggt	921
Gln	Thr	Phe	Leu	Asn	Ile	Ile	Asn	Glu	Asn	Ile	Pro	Glu	Leu	Lys	Gly	
		275				280					285					
aag	gtt	gcc	cta	gga	gat	cca	gct	tca	gag	aag	gag	ttg	att	gaa	aag	969
Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Asp	Pro	Ala	Ser	Glu	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Lys	
290					295					300				305		
cac	aca	gat	aag	tat	gat	ttg	aca	aat	ctt	cac	aac	gtt	att	ggt	aaa	1017
His	Thr	Asp	Lys	Tyr	Asp	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Asn	Val	Ile	Gly	Lys	
				310					315				320			
tat	gat	ttc	att	cca	gtt	gaa	aag	tcc	gtt	gtc	gac	gtc	tta	gaa	caa	1065
Tyr	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Asp	Val	Leu	Glu	Gln	
			325					330					335			

tat tac aaa atc aat aaa att gat tag tttatataga aaatittata 1112  
Tyr Tyr Lys Ile Asn Lys Ile Asp  
340 345  
gctaaaggcc gaatcaactt ctttcttcct cttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1172  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1212

<210> 12  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 12  
cggaattcat gtcgaacaaa acagttctag tcacc 35

<210> 13  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 13  
gctctagatt aatcaatttt attgattttg taatattg 38

## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 医薬、農薬等の中間体原料として産業上有用な化合物である (S) - 2 - ペンタノール、又は、(S) - 2 - ヘキサノールを高光学純度かつ高収率で得ることができる製造方法を提供する。

【解決手段】 2 - ペンタノン又は 2 - ヘキサノンに、イサチェンキア (Issatchenkia) 属酵母由来のカルボニル還元酵素をコードする DNA を発現させた形質転換体細胞、該細胞処理物及び／又は培養物を作用させ、(S) - 2 - ペンタノール又は (S) - 2 - ヘキサノールを生成させる。2 - ペンタノン又は 2 - ヘキサノンに、ブレッタノマイセス (Brettanomyces) 属、キャンディダ (Candida) 属、デッケラ (Dekkera) 属、ホルテア (Hortaea) 属、イサチェンキア (Issatchenkia) 属、ロッデロマイセス (Lodderomyces) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、又は、ロドトルラ (Rhodotorula) 属の微生物、該微生物処理物及び／又は培養液を作用させ、(S) - 2 - ペンタノール又は (S) - 2 - ヘキサノールを生成させる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 2 7 8 1 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 6 0 2 0 4 6 4 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 8 日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府大阪市中央区平野町二丁目 4 番 9 号

氏 名

株式会社エーピーアイ コーポレーション